

# 再生医療製品におけるLC/MS/MSによる 残留抗生物質の濃度測定法の確立

ヒトから採取した細胞を培養して、細胞・組織等の再生医療製品を製造する際には、抗生物質を使用することが多い。抗生物質はアレルギー等を引き起こす場合があるため、製品中に残留する抗生物質が安全上問題のないレベルであることを評価する必要がある。そこで、ES/iPS細胞培養で使用されるマイトマイシンC及びペニシリンGをモデルに、高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析法(LC/MS/MS)による細胞培養液及び洗浄液中の抗生物質同時定量法を確立した。測定の実例として、mouse embryonic fibroblast (MEF) 培養中の培地及び培養細胞洗浄液中の抗生物質の測定を行った。

## 再生医療製品の不純物測定の必要性と測定のポイント

厚生労働省通知

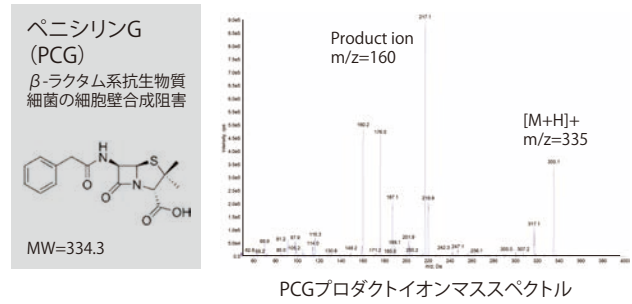
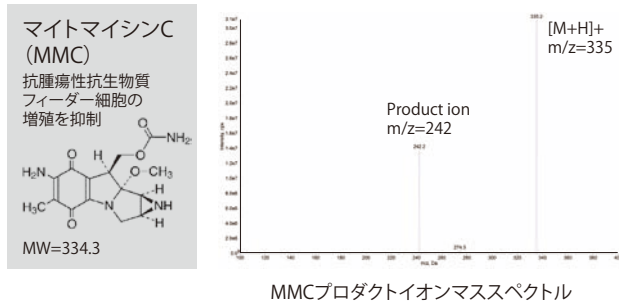
薬食発第0208003号平成20年2月8日及び  
薬食発第0912006号平成20年9月12日

再生医療製品の品質管理として、製造工程由来の不純物(抗生物質など)の把握が必要である。

### 再生医療製品中の抗生物質測定のポイント

- ・製品中の残留レベル:可能な限り低濃度まで測定する必要がある。
- ・測定の妨害となる多くの夾雑物(アミノ酸類、ビタミン類、血清由来タンパク、無機塩)の影響を排除する必要がある。

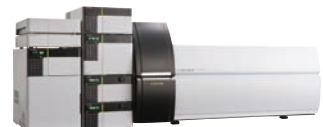
## 測定対象



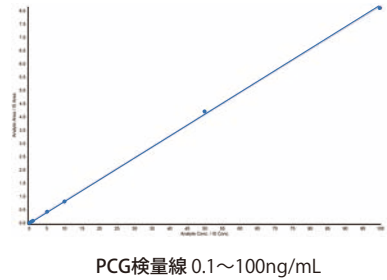
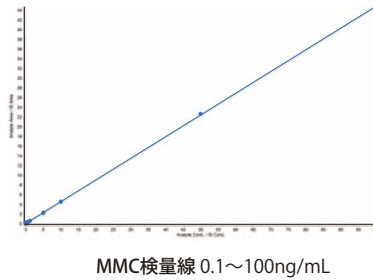
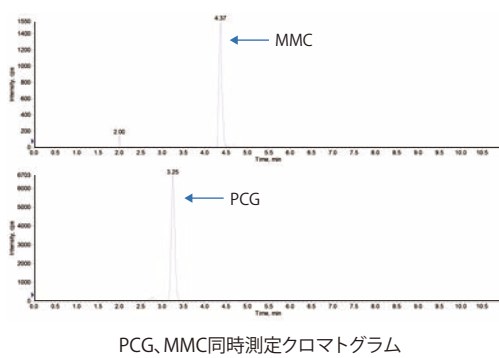
アミノ基(-NH<sub>2</sub>)あるいは、イミノ基(-NH-)を持ち、ポジティブイオンとして検出可能。同一m/zのプロトン付加イオンを生成するが、Selected Reaction Monitoring (SRM)により異なるm/zのプロダクトイオンを検出。

## 抗生物質の定量法

	微生物学的力価試験法 (日本薬局方)	高速液体クロマトグラフ法 (HPLC-UV)	高速液体クロマトグラフ タンデム型質量分析法(LC/MS/MS)
測定方法	抗菌活性に基づく測定	クロマトグラフィーによる分離とUV検出器による検出	クロマトグラフィーによる分離と質量分析計による検出
選択性	×	○ UV吸収を持つ化合物のみ検出	◎ 高い選択性
感度	△ mgオーダー以上	○ µgオーダーまで可能	◎ pgオーダーまで可能
測定時間	△ 数日	◎ 数十分以内	◎ 約10分以内
用途	抗生物質原薬・製剤等の力価測定	抗生物質原薬・製剤等定量法、 洗浄バリデーション試験	生体試料中微量分析 洗浄バリデーション試験
細胞、培養液等の測定の可否	×	△ 微量測定は困難、共存する夾雑物の影響大	◎ 複雑なマトリックス中でも高感度測定が可能

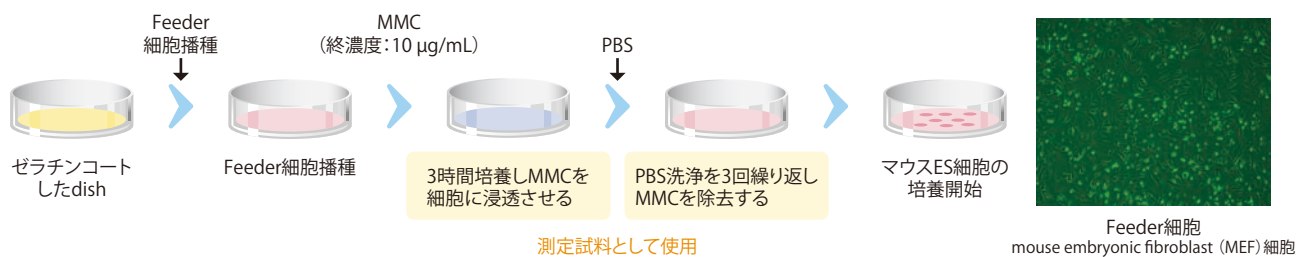


## 標準溶液測定のカロマトグラムおよび検量線

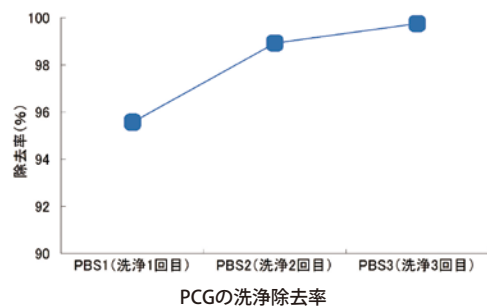


約10分の測定時間で同時測定可能  
直線性良好 ( $r = 0.9999$ )  
装置導入絶対量0.5pgで検出可能

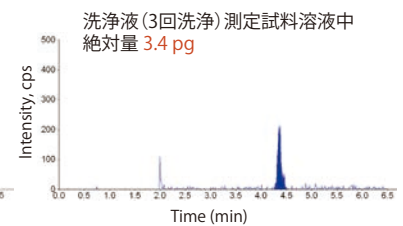
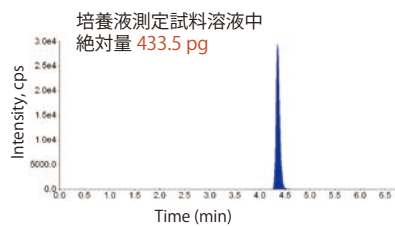
## マウスES細胞培養のためのFeeder細胞の培養および増殖停止処理



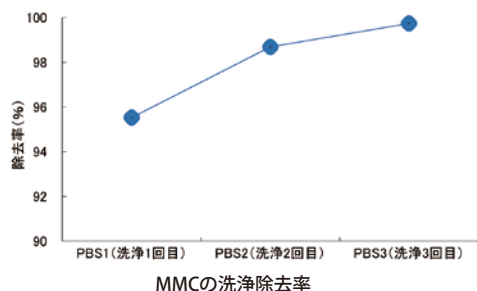
## 細胞洗浄によるPCGの除去



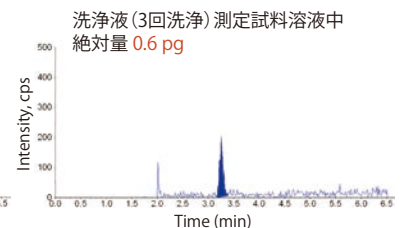
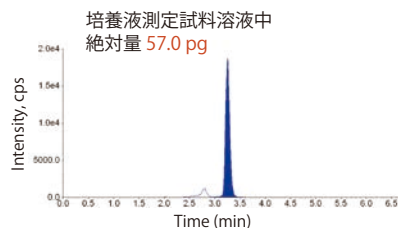
培養液中PCGはPBSによる3回洗浄により、99.8%除去。



## 細胞洗浄によるMMCの除去



培養液中MMCはPBSによる3回洗浄により、99.7%除去。



高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析法 (LC/MS/MS) による細胞培養液及び洗浄液中のペニシリンG及びマイトマイシンCの同時定量法を確立した。PCG、MMCいずれも0.1~100ng/mLの濃度範囲で濃度とレスポンスが良好な直線性を示し、夾雑物の多い培地及び細胞洗浄液中の微量のPCG及びMMCの同時定量が可能であった。本法は、培地や洗浄液だけでなく、細胞や組織中の微量抗生物質濃度測定に応用可能であった。再生医療製品中の残留抗生物質の定量法として用いることができ、再生医療製品の品質管理に役立つと考えられる。